

Title	Combined multiphoton imaging and biaxial tissue extension for quantitative analysis of geometric fiber organization in human reticular dermis(Abstract_要旨)
Author(s)	Ueda, Maho
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2020-03-23
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k22342
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士（ 医 学）	氏 名	上田 真帆
論文題目	Combined multiphoton imaging and biaxial tissue extension for quantitative analysis of geometric fiber organization in human reticular dermis (多光子顕微鏡と 2 軸伸展を用いたヒト真皮網状層の線維構造の定量的解析)		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>ヒトの皮膚は表皮と真皮から成る。臨床では植皮片に含める真皮網状層が多いほど、質感や柔軟性が増すことが知られている。真皮はコラーゲン線維や弾性線維などの線維成分と液状の基質で構成される。皮膚の機械的特性に関連して線維成分の幾何学的構造が研究されてきたが、現在でもコラーゲン線維がどのように分布し、それらが弾性線維とどのような位置関係にあるかについてはよくわかっていない。なぜなら、コラーゲン線維は真皮内で複雑に変形し密集しているため、個々の線維を連続的に同定することが困難であるからである。コラーゲン線維の三次元構造を定量的に評価できなければ、それらと弾性線維との関係も正確に評価することはできない。この問題を解決すべく、組織を全方向に伸展してコラーゲン線維を直線化すれば、線維間隙が拡大し、線維が同定しやすくなると考えた。本研究の目的は、二軸組織伸展法と多光子顕微鏡を複合し、コラーゲン線維と弾性線維の三次元幾何学的構造を定量的に解析することである。</p> <p>開発した二軸組織伸展システムは中空ディスクとドーナツ型プーリーで構成され、ディスクに取り付けられたシート状の組織はプーリーによって全方向に引き伸ばされる。まず伸展により真皮内線維の位置関係が温存されるかを検証した。新鮮な真皮シートを漸増的に伸展しながら多光子顕微鏡で観察した。コラーゲン線維は伸展とともに直線状となった。伸展前後の弾性線維の主成分ベクトルを同定し、ベクトルの類似性をコサイン類似度で評価したところ、0.99 と高い類似性を示した。</p> <p>次に与える伸展の程度を決定するために応力ひずみ試験を行った。低応力領域に相当する伸展率は約 1.25 であった。これより顕微鏡観察に最適な伸展率を 1.25 と決定した。</p> <p>続いて、ヒト全層皮膚を用いて真皮内線維の三次元構造解析を行った。1.25 倍に二軸伸展した状態で皮膚サンプルを固定し、組織透明化処理を加えた。組織透明化は CUBIC 法を採用した。コラーゲン線維の描出には第二高調波励起を、弾性線維の描出には二光子自家蛍光を用いた。まず二軸伸展の有無で描出の違いを評価した。無伸展と比較して二軸伸展した方がより明瞭にコラーゲン線維が描出された。約 500 μ m(末伸展の 850 μ m 相当)の深さまで観察が可能であった。続いて三次元空間におけるコラーゲン線維の分布を定量的に解析した。一画像ごとにフーリエ変換を行い、パラメータとして線維の配向角度と配向強度を求めた。深さとパラメータとの関係性を評価し、配向強度のピークに一致してコラーゲン線維束が出現することを利用して、ピーク解析から線維束を同定した。線維束の配向角度を集計したヒストグラムにガウスフィッティングを行い、頻値を求めた。全サンプルにおいて網状層浅層で 2 または 3 の頻値が認められた。主となる頻値を第 1 頻値、その次を第 2 頻値と定義すると、</p>			

<p>それらの角度差は平均66度であった。浅層と深層の第1頻値の角度差は平均9度であり、浅層と深層でコラーゲンの主分布の方向が類似していることが示された。さらにコラーゲンと弾性線維の位置関係を評価した。浅層で線維の94%、深層で線維の85%が角度差15度未満であり、コラーゲンと弾性線維の分布が類似していることが示された。</p> <p>本研究ではヒト真皮網状層におけるコラーゲン線維の多軸性配向と、コラーゲン線維と弾性線維の共局在性を明らかにした。二軸伸展法は血管壁などの真皮以外の臓器にも応用可能であり、複雑な線維構造の解析に有用な手法と考えられた。ヒト真皮の三次元構造を理解することは、より生理的な皮膚を再生する研究に貢献する可能性がある。</p>
<p>（論文審査の結果の要旨）</p> <p>ヒト真皮網状層は形成外科と深く関わりがある。これまで真皮内のコラーゲン線維や弾性線維の構造について研究されてきたが、それらの幾何学的配置に関する詳細は明らかではなかった。その理由はたわみや密集により、線維の方向を正確に同定することが困難だからである。本研究ではその問題を解決するため、多光子顕微鏡と組織透明化法、そして二軸伸展法を併用した新しいイメージング手法の開発を行った。</p> <p>独自に二軸伸展装置を開発した。まず新鮮ヒト真皮シートを装置で伸展しながら多光子顕微鏡で観察を行った。弾性線維網が伸展前の方向を保ったまま拡張することが示された。次に二軸伸展したヒト皮膚サンプルに組織透明化処理を行い、多光子顕微鏡で網状層の観察を行った。500μm(末伸展の850μm相当)の深さまでたわみの無いコラーゲン線維が明瞭に描出された。続いて線維配向解析を行った。浅層で2または3つの分布を、深層で1または2つの分布を認め、主たる分布については両層間で類似性を認めた。また、局所的なコラーゲン線維と弾性線維の角度差を評価したところ、浅層で線維の94%が、深層で線維の85%が角度差15度未満であり、それらの線維が類似する方向に分布することが示された。</p> <p>以上の研究はヒト真皮網状層の線維構造を観察・解析する新しい手法と、幾何学的構造に関する新しい知見を与え、今後の皮膚科学・形成外科学の発展に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、令和2年2月6日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
要旨公開可能日： 年 月 日以降